

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-132189

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)6月19日

C 12 N 15/00
C 07 H 21/02
// C 12 P 21/02

7115-4B
6742-4C
7235-4B

審査請求 有 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNAおよびその調製法

⑯ 特 願 昭59-254217

⑰ 出 願 昭59(1984)12月3日

⑱ 発 明 者 深 澤 親 房 茨城県新治郡桜村吾妻2丁目802-203

⑲ 出 願 人 農林水産省食品総合研
究所長

⑳ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

明 細 書

1. 発明の名称

ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNA
およびその調製法

2. 特許請求の範囲

(1) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA。

(2) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNAをダイズ種子より抽出し分画することを特徴とするメッセンジャーRNAの調製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA(以下mRNAと略す。)およびその調製法に関する。

ダイズ種子に蓄えられる物質の主なものとしてタンパク質、脂質およびフィチン酸塩などが知られているが、これらの貯蔵物質が種子の発熟過程でどのように合成され、蓄積されるのかを知るとは種子生理学的見地からはもとより食品化学の面からも重要である。

本発明者はダイズ貯蔵タンパク質の生理学的役割、生産方法等について研究を重ねてきたが、その過程においてダイズ種子からダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出することに成功し、このmRNAからこれに対応する相補的DNA(以下cDNAと略す。)を調製することに成功した。このようにして得たDNAを微生物細胞内あるいは植物細胞内で発現させることにより目的とするダイズ貯蔵タンパク質を製造することができ。

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるmRNAおよびその製造法を提供するものである。

本発明の mRNA は、上記したようにダイズ貯蔵タンパク質に対応し、シロ糖密度勾配遠心法やゲル濾過法による分画ならびにアガロース電気泳動法により 18S よりやや重い画分として得られるものであり、この mRNA はダイズ種子より抽出分離することによって製造できる。

本発明に用いる mRNA の材料としては種々の過程、たとえば登熟期にあるダイズ種子を使用できる。

ダイズ種子よりダイズ貯蔵タンパク質に対応する mRNA を抽出するには種子の種類を問わず常法によって行なえばよい。たとえば組織を 2~5 容の NP-40, SDS, Triton X-100 などの界面活性剤とフェノール溶液を混合してホモゲナイザーや凍結融解などの物理的方法を用いて細胞を破碎、可溶化し、遠心した後の上清に冷エタノールを加えて RNA を沈殿させる。

また、必要に応じてダイズ貯蔵タンパク質に対応する抗体を用いてダイズ貯蔵タンパク質合成途上のポリゾームを沈降せしめ、これにより mRNA

を界面活性剤などで抽出する方法を行なうことができる。

また、本発明の mRNA の精製については、オリゴdT-セルロース、ポリウーセファロースなどの吸着カラムによる精製法、等速 (isokinetic) なシロ糖密度包配遠心法による分画等によって行なうことができる。このような精製操作により本発明の mRNA は 18S よりやや重い画分として得られる。

上記の如くして得られた mRNA が目的とするダイズ貯蔵タンパク質に対応するものであることを確認するためには、mRNA をタンパク質に翻訳させ、その抗体等を用いてそのタンパク質を同定する等の方法を行なえばよい。たとえば mRNA をタンパク質に翻訳するのによく用いられる系である Reticulocyte-lysate (網状赤血球ライゼート), Wheat germ (コムギ胚芽) などの無細胞系でタンパク質に翻訳させることが行なわれる。

かくして得られたダイズ貯蔵タンパク質 mRNA の最大の利用法は、これらの mRNA よりインビ

トロで cDNA を合成し、適当なベクターなどに組み込んで微生物あるいは植物等でダイズ貯蔵タンパク質を生産することを可能ならしめることにある。

このような cDNA の合成は通常、試験管内で次のような方法で行なうことができる。mRNA を鋳型としてオリゴdT をプライマーとして dATP, dGTP, dCTP, dTTP の存在下で逆転写酵素により mRNA と相補的な単鎖 cDNA を合成し、アルカリ処理で鋳型 mRNA を分解・除去した後、オリゴdC を付加し、次いでオリゴdG をプライマーとして単鎖 cDNA を鋳型にして逆転写酵素あるいは DNA ポリメラーゼを用いて二重鎖 cDNA を合成する。このようにして得られた DNA 両端を必要によりエキソヌクレアーゼで処理し、それぞれに適当な DNA を接続しあるいはアニーリング可能な組合わせの塩基を複数個重合せしめる。しかる後、これを微生物ベクターに組み込む。組み込む方法はベクターを適当な制限酵素で切断し、必要により適当なり

ンカーまたはアニーリング可能な組合わせの塩基を複数個重合せしめる。このように加工した二重鎖 DNA とベクター DNA を混合し、リガーゼを用いて接続せしめる。

得られた組み換え DNA はベクターの宿主微生物に導入する。宿主微生物としてはエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属の微生物、バチルス・ズブチリス等のバチルス属の微生物、サッカロミセス・セレビシエ等のサッカロミセス属の微生物などが好適である。これらの微生物に使用されるベクターを以下に例示する。(蛋白質核酸酵素 26 巻 4 号 (1981) 参照) EK 系プラスミドベクター (ストリンジエンド型) の pSC101, pRK353, pRK646, pRK248, pDF41 等、EK 系プラスミドベクター (リラックスド型) の CalB1, pVH51, pAC105, pRF2124, pCR1, pMB9, BR313, pBR322, pBR324, pBR325, pBR327, pBR328, pKY2289, pKY2700, pKN80, pKC7, pKB158, pMK2004, pACYC1, pACYC184,

λ dul 等, λ gt系ファージベクターの λ gt \cdot λ c \cdot λ gt \cdot λ B, λ WES \cdot λ B', λ Z Jvir \cdot λ B', λ ALO \cdot λ B, λ WES \cdot Ts622, λ Dam等, シャロンベクターのシャロン4A, シャロン3A, シャロン16A, シャロン13A, シャロン14A, シャロン15A, シャロン8, シャロン10, シャロン17, シャロン20等, チオライス (Tollais) グループベクターのL512, λ ZEQS, λ ZYV5 ϕ , λ ZUV ϕ 2, λ ZUV ϕ 3, λ YEQS ϕ 1, λ YEQS ϕ , λ YEQS ϕ 3, λ Bam, λ Sst等, 枯草菌のプラスミドベクターpTA1015, pLS15, pTA1020, pLS28, pLS13, pTA1050, pTA1060, pTA1030, pTA1031等, スタフィロコッカス由来のプラスミドベクターpT127, pC194, pC221, pC223, pUB112, pUB110, pSA0501, pSA2100, pE194, pTP4, pTP5等, 酵母ベクターpJDB219, YEp13, YRp7, YIp1, pYC, pTC2.

微生物のベクター、たとえばpBR322などのPst IあるいはEcoRI siteなど目的に応じた個

所に組み込み、適当な宿主にトランスホームしてそのダイズ貯蔵タンパク質を宿主中で発現させることができる。

得られたmRNAがダイズ貯蔵タンパク質に対応する遺伝情報を有していることを以下の方法により確認する。

Reticulocyte lysate あるいは Wheat germ の系を用いPositive hybrid selection and invitro translation 法によりダイズ貯蔵タンパク質であることを同定する。

また、植物においてT-DNA ⁽⁵⁾ter領域を含むpAL1050ベクターを用いて遺伝子を植物に導入する。

組み換えDNAを挿入する場合 terのリーダー配列にin-frameに接続し、終止コドン領域もterのものを利用する。

上述のようにダイズ種子より本発明のmRNAを調製する方法を以下の実施例により詳しく説明する。なお、本実施例に示す以下のダイズ種子より得られる貯蔵タンパク質に対応するmRNAの

場合にも本発明は全く同様に実施できるものであり、本発明の範囲に含まれる。

実施例1

(1) 完熟ダイズからグリシニン(ダイズ主要貯蔵タンパク質の1つ)を精製し、酸性(以下、Aと略称する。)サブユニットを分離、精製する。このAサブユニットは分子量約35~40Kで、互いに免疫化学的に強い交叉性を示す。そこで、個々のAサブユニットに特異的な抗血清を調製する。抗血清の調製法としては、たとえば特定サブユニットでウサギに十分免疫(hyperimmunization)して得た抗血清に、他の酸性サブユニットタンパクの凍結乾燥粉末を加えて吸収操作を繰り返す方法が適用できる。特異性の検定は、オクテルローニのゲル内二重拡散法とウエスタンブロット法によった。

(2) 登熟中期(開花後38日目)のダイズ子葉から膜結合型ポリソームを調製し、SDS-フェノール法とポリウーセファロースカラム法でmRNAを精製する。一方、同じ時期の子葉から同様にし

て全mRNAを調製する。この全mRNA標品の一部はショ糖密度勾配遠心法(ショ糖10%(w/w)~30%(w/w))により分画し、赤血球無細胞タンパク合成系における翻訳産物の免疫化学的解析でグリシニンmRNA濃縮画分を同定する。

(3) 上記(2)の全mRNAに対するcDNAライブラリーを以下に記述する方法に従って作製する。

1) ss-cDNAの合成と構型mRNAのアルカリ分解シリコナイズしたエッペンドルチューブ(1.5ml)に10 μ lのX10cDNA緩衝液(0.5 M トリス-塩酸, 1.4 M 塩化カリウム, 0.8 M 酢酸マグネシウム), 3 μ lのRNasin(生化学工業40u/ μ l), 5 μ lのdATP, 5 μ lのdGTP, 4 μ lのdCTPおよびdTTP, 24 μ lのオリゴ(dT)₁₂₋₁₈(P-L Biochemicals社製, 0.2 mg/ml), 8 μ lのアクチノマイシンD(0.4 μ g/ μ l), 1 μ lの0.1 M DTT, 6 μ lの(α -³²P)dATPおよび10 μ lのmRNA(1 μ g/ μ l, 65 $^{\circ}$ C, 10分間処理した

後、急冷したもの)をこの順番に加えて混合して1秒間遠心し、液を底に集める。

42℃で2分間保温⁵後、20μℓのAMV逆転写酵素を加えて軽く混合し、1秒間遠心してこの混液(100μℓ)を42℃で60分間保温する。

反応液に20μℓの5M塩化ナトリウム、16μℓの250mMEDTA、2μℓの20%SDSおよび62μℓの蒸留水を加えて反応を止める。

これにフェノール混液(10mMトリス-塩酸(pH8.3)-2mMEDTAで飽和したフェノール液)200μℓを加えて激しく振盪する。

遠心して水層をとり、残りのフェノール層に122μℓの蒸留水、48μℓの5M塩化ナトリウム溶液を加えて再抽出し、先の水層と合わせてエーテル処理をして混入したフェノールを除去した後、30μℓの酢酸カリウム(pH5.0)と600μℓの冷エタノールを加えてエタノール沈殿する(ドライアイス-エタノール中で30分間または-70℃で1時間)。

この操作により約3~5μgのcDNAが得ら

i)で調製乾燥したss-cDNA(シリコナイズしたエッペンドルフチューブに入っている)に25μℓの蒸留水を加えて溶解し、遠心して底に集めて65℃で10分間処理し、急冷する。再び1秒間遠心し、これに5μℓのX10dT緩衝液(1.4Mカコジル酸カリウム(pH7.6)、0.6Mトリス塩基(19.3gのカコジル酸(free acid)と7.2gのトリズマ・ベース(Sigma社製)を50mℓの再蒸留水に溶かし、水酸化カリウムの粉末を加えてpHを7.6に調整、滅菌する)、5μℓの塩化コバルト、5μℓのDTTおよび5μℓのdCTPを加え十分に混合し遠心する。

これに5μℓのdT(4u/μℓ)を加えて軽く混合し、15℃で10分間保温する。この反応混液に10μℓの5M塩化ナトリウム、4μℓの250mMEDTA、36μℓの蒸留水を加え70℃で5分間熱処理する。

フェノール抽出後エタノール沈殿、洗浄後乾燥する。

iii) ds-cDNAの作製

れる。このss-cDNAを減圧乾燥し、45μℓの蒸留水を加えて溶解する。

これに5μℓの5N水酸化ナトリウム溶液を加えて混合し、1秒間遠心して液をチューブの底に集めて25℃で一晩保温し、mRNAを分解する。

50μℓのHepes-KOH(pH7.4)緩衝液を加えた後、ウルトロゲルAcA44のカラム(ゲルベットの高さ28cm)にのせて約0.6mℓずつ分画する。void volume 画分(この条件ではフラクション番号6~8、GMサーベイメーターでチェックまたは液体シンチレーションカウンターを用いてCerenkov法で測定)を集める。

この画分に1/10容量の3M酢酸カリウム、2倍量の冷エタノールを加えて-70℃で1時間放置後遠心沈殿させ、2回70%エタノールで沈殿物を洗い(沈殿物をはがさないように静かにエタノールを重ねし、10分間遠心しながらrinseする)、減圧乾燥する。

ii) ss-cDNAの3'-OH末端へのdCホモポリマーの付加

上記ii)で作製した3'末端にdCホモポリマーを付加したss-cDNA標品(シリコナイズしたエッペンドルフチューブ中で乾燥保存したもの)に26μℓの蒸留水を加えて十分に溶解し、68℃、5分間処理後急冷する。

1秒間遠心後、10μℓのX10cDNA緩衝液、1μℓのDTT、10μℓのdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP、15μℓのオリゴ(dG)₁₂₋₁₈を加えて混合後遠心し、次いで13μℓの逆転写酵素(5.8u/μℓ)を加えて42℃で1時間保温する。

反応液に20μℓの5M塩化ナトリウム、8μℓの250mMEDTA、2μℓの20%SDSおよび70μℓの蒸留水を加えて反応を停止させる。

常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および乾燥後、40μℓの蒸留水を加えて溶解し、62℃、5分間処理後急冷し、遠心する。

これにX10Klenow緩衝液(0.67MK-リン酸緩衝液(pH7.4)、67mM塩化マグネシウム、10mM DTT)を10μℓ、dATP、dGTP、

dCTPおよびdTTPの各10 μ lずつを加えて、よく混合した後、DNAポリメラーゼI (Klenow 酵素, 5u/ μ l)を10 μ l加えて37℃で1時間反応させる。

40 μ lの5M塩化ナトリウム, 16 μ lの250 mM EDTA, 4 μ lの20% SDSおよび140 μ lの蒸留水を加えて反応を止めた後、フェノール抽出、エタノール沈殿を常法に従って行なう。必要とあれば、この段階でゲル電気泳動または中性ショ糖密度勾配法により低分子のds-cDNAを除去することもできる。

ds-cDNAに100 μ lの蒸留水を加えて溶解し、ウルトロゲルAcA44のカラム(ゲルベッドの高さ28cm)にのせて約0.6mlずつ分画し、void volume画分を集める(溶出パターンは液体シンチレーションカウンターを用いたGorenkov法で測定する)。

この画分に1/10量の3M酢酸カリウム, 2倍量の冷エタノールを加えて-70℃で1時間放置後、生じたds-cDNAの沈殿を遠心乾燥により回

ゴ(dG) (contaminated)を加えて混合し、68℃, 5分間処理した後、43℃にした恒温水槽中に移し2時間保温する。

恒温槽のスイッチを切り、少なくとも2時間以上(一晚そのまましておいてもよい)放置して室温まで下げた後、チューブを4℃に保存する。

vi) 形質転換(トランスフォーメーション)

DagertとEhrlichの方法によりRR1を宿主として $8.2 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^7$ 個形質転換株/ μ g pBR322 DNAの転換効率を得た。

(4)(2)のグリシニン中間サブユニットmRNAの濃縮画分に対する 32 P標識cDNAを作製しプローブとする。

(5)上記(4)で作製したプローブを用いて(3)のcDNAライブラリーの中からグリシニンサブユニットクローンをコロニーハイブリダイゼーション法で選別する。1023個のクローンのうち22個が陽性であった。

6)上記(5)で得た22個のクローンの中から挿入部分の長さが1kb以上のクローン(16個)を選

収し、洗浄、減圧乾燥する。

iv) プラスミドへ挿入のためのds-cDNAの末端加工

上記ii)で調製したds-cDNAに37 μ lの蒸留水を加えて溶解し、5 μ lのX10TdT緩衝液, 5 μ lのdCTDを加えて十分混合した後、3 μ lのTdTを加えて37℃で5分間保温する。

反応後、10 μ lの5M塩化ナトリウム, 4 μ lの250 mM EDTAおよび36 μ lの蒸留水を加えて70℃で5分間処理した後、常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および減圧乾燥を行なう。

v) PstI切断3'末端オリゴdG付加pBR322とのアニーリング

ds-cDNA溶液(450 μ l)に50 μ lのX10アニーリング緩衝液(0.1Mトリス-塩酸(pH7.5), 1M塩化ナトリウム, 10mMEDTA)を加えて十分混合し、その100 μ lをとりエペンドルフチューブ(1.5ml, シリコナイズしたもの)に入れる。これに1 μ lのpBR322(オリ

び"positive hybrid selection and invitro translation"法によりグリシニンcDNAクローンを同定した。このうちの1つは約2kbの挿入部分を持っていた。このクローンをプローブとしたノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果からグリシニンmRNAの長さは約2.2kbであり、作製されたcDNAは完全長に近い。

クローニングしたcDNAのうちの1つグリシニンA, B, サブユニットcDNAの構造は第1表の通りであった。

実施例2

実施例1と同様の方法で得られたもう一つのグリシニンA, A, B, サブユニットcDNAの構造は第2表の構造であった。



[illegible]

表 2
(ダイズグリシニンA、A、B、c DNAの塩基配列)

..... A₃ A C T T A A T T A T T A A C A C T T C C T T A G T T C A A T A₁ T G C G₁ C A₂ A G C₂ C₃ C₄ C₅ C₆ C₇ C₈ C₉ C₁₀ C₁₁ C₁₂ C₁₃ C₁₄ C₁₅ C₁₆ C₁₇ C₁₈ C₁₉ C₂₀ C₂₁ C₂₂ C₂₃ C₂₄ C₂₅ C₂₆ C₂₇ C₂₈ C₂₉ C₃₀ C₃₁ C₃₂ C₃₃ C₃₄ C₃₅ C₃₆ C₃₇ C₃₈ C₃₉ C₄₀ C₄₁ C₄₂ C₄₃ C₄₄ C₄₅ C₄₆ C₄₇ C₄₈ C₄₉ C₅₀ C₅₁ C₅₂ C₅₃ C₅₄ C₅₅ C₅₆ C₅₇ C₅₈ C₅₉ C₆₀ C₆₁ C₆₂ C₆₃ C₆₄ C₆₅ C₆₆ C₆₇ C₆₈ C₆₉ C₇₀ C₇₁ C₇₂ C₇₃ C₇₄ C₇₅ C₇₆ C₇₇ C₇₈ C₇₉ C₈₀ C₈₁ C₈₂ C₈₃ C₈₄ C₈₅ C₈₆ C₈₇ C₈₈ C₈₉ C₉₀ C₉₁ C₉₂ C₉₃ C₉₄ C₉₅ C₉₆ C₉₇ C₉₈ C₉₉ C₁₀₀ C₁₀₁ C₁₀₂ C₁₀₃ C₁₀₄ C₁₀₅ C₁₀₆ C₁₀₇ C₁₀₈ C₁₀₉ C₁₁₀ C₁₁₁ C₁₁₂ C₁₁₃ C₁₁₄ C₁₁₅ C₁₁₆ C₁₁₇ C₁₁₈ C₁₁₉ C₁₂₀ C₁₂₁ C₁₂₂ C₁₂₃ C₁₂₄ C₁₂₅ C₁₂₆ C₁₂₇ C₁₂₈ C₁₂₉ C₁₃₀ C₁₃₁ C₁₃₂ C₁₃₃ C₁₃₄ C₁₃₅ C₁₃₆ C₁₃₇ C₁₃₈ C₁₃₉ C₁₄₀ C₁₄₁ C₁₄₂ C₁₄₃ C₁₄₄ C₁₄₅ C₁₄₆ C₁₄₇ C₁₄₈ C₁₄₉ C₁₅₀ C₁₅₁ C₁₅₂ C₁₅₃ C₁₅₄ C₁₅₅ C₁₅₆ C₁₅₇ C₁₅₈ C₁₅₉ C₁₆₀ C₁₆₁ C₁₆₂ C₁₆₃ C₁₆₄ C₁₆₅ C₁₆₆ C₁₆₇ C₁₆₈ C₁₆₉ C₁₇₀ C₁₇₁ C₁₇₂ C₁₇₃ C₁₇₄ C₁₇₅ C₁₇₆ C₁₇₇ C₁₇₈ C₁₇₉ C₁₈₀ C₁₈₁ C₁₈₂ C₁₈₃ C₁₈₄ C₁₈₅ C₁₈₆ C₁₈₇ C₁₈₈ C₁₈₉ C₁₉₀ C₁₉₁ C₁₉₂ C₁₉₃ C₁₉₄ C₁₉₅ C₁₉₆ C₁₉₇ C₁₉₈ C₁₉₉ C₂₀₀ C₂₀₁ C₂₀₂ C₂₀₃ C₂₀₄ C₂₀₅ C₂₀₆ C₂₀₇ C₂₀₈ C₂₀₉ C₂₁₀ C₂₁₁ C₂₁₂ C₂₁₃ C₂₁₄ C₂₁₅ C₂₁₆ C₂₁₇ C₂₁₈ C₂₁₉ C₂₂₀ C₂₂₁ C₂₂₂ C₂₂₃ C₂₂₄ C₂₂₅ C₂₂₆ C₂₂₇ C₂₂₈ C₂₂₉ C₂₃₀ C₂₃₁ C₂₃₂ C₂₃₃ C₂₃₄ C₂₃₅ C₂₃₆ C₂₃₇ C₂₃₈ C₂₃₉ C₂₄₀ C₂₄₁ C₂₄₂ C₂₄₃ C₂₄₄ C₂₄₅ C₂₄₆ C₂₄₇ C₂₄₈ C₂₄₉ C₂₅₀ C₂₅₁ C₂₅₂ C₂₅₃ C₂₅₄ C₂₅₅ C₂₅₆ C₂₅₇ C₂₅₈ C₂₅₉ C₂₆₀ C₂₆₁ C₂₆₂ C₂₆₃ C₂₆₄ C₂₆₅ C₂₆₆ C₂₆₇ C₂₆₈ C₂₆₉ C₂₇₀ C₂₇₁ C₂₇₂ C₂₇₃ C₂₇₄ C₂₇₅ C₂₇₆ C₂₇₇ C₂₇₈ C₂₇₉ C₂₈₀ C₂₈₁ C₂₈₂ C₂₈₃ C₂₈₄ C₂₈₅ C₂₈₆ C₂₈₇ C₂₈₈ C₂₈₉ C₂₉₀ C₂₉₁ C₂₉₂ C₂₉₃ C₂₉₄ C₂₉₅ C₂₉₆ C₂₉₇ C₂₉₈ C₂₉₉ C₃₀₀ C₃₀₁ C₃₀₂ C₃₀₃ C₃₀₄ C₃₀₅ C₃₀₆ C₃₀₇ C₃₀₈ C₃₀₉ C₃₁₀ C₃₁₁ C₃₁₂ C₃₁₃ C₃₁₄ C₃₁₅ C₃₁₆ C₃₁₇ C₃₁₈ C₃₁₉ C₃₂₀ C₃₂₁ C₃₂₂ C₃₂₃ C₃₂₄ C₃₂₅ C₃₂₆ C₃₂₇ C₃₂₈ C₃₂₉ C₃₃₀ C₃₃₁ C₃₃₂ C₃₃₃ C₃₃₄ C₃₃₅ C₃₃₆ C₃₃₇ C₃₃₈ C₃₃₉ C₃₄₀ C₃₄₁ C₃₄₂ C₃₄₃ C₃₄₄ C₃₄₅ C₃₄₆ C₃₄₇ C₃₄₈ C₃₄₉ C₃₅₀ C₃₅₁ C₃₅₂ C₃₅₃ C₃₅₄ C₃₅₅ C₃₅₆ C₃₅₇ C₃₅₈ C₃₅₉ C₃₆₀ C₃₆₁ C₃₆₂ C₃₆₃ C₃₆₄ C₃₆₅ C₃₆₆ C₃₆₇ C₃₆₈ C₃₆₉ C₃₇₀ C₃₇₁ C₃₇₂ C₃₇₃ C₃₇₄ C₃₇₅ C₃₇₆ C₃₇₇ C₃₇₈ C₃₇₉ C₃₈₀ C₃₈₁ C₃₈₂ C₃₈₃ C₃₈₄ C₃₈₅ C₃₈₆ C₃₈₇ C₃₈₈ C₃₈₉ C₃₉₀ C₃₉₁ C₃₉₂ C₃₉₃ C₃₉₄ C₃₉₅ C₃₉₆ C₃₉₇ C₃₉₈ C₃₉₉ C₄₀₀ C₄₀₁ C₄₀₂ C₄₀₃ C₄₀₄ C₄₀₅ C₄₀₆ C₄₀₇ C₄₀₈ C₄₀₉ C₄₁₀ C₄₁₁ C₄₁₂ C₄₁₃ C₄₁₄ C₄₁₅ C₄₁₆ C₄₁₇ C₄₁₈ C₄₁₉ C₄₂₀ C₄₂₁ C₄₂₂ C₄₂₃ C₄₂₄ C₄₂₅ C₄₂₆ C₄₂₇ C₄₂₈ C₄₂₉ C₄₃₀ C₄₃₁ C₄₃₂ C₄₃₃ C₄₃₄ C₄₃₅ C₄₃₆ C₄₃₇ C₄₃₈ C₄₃₉ C₄₄₀ C₄₄₁ C₄₄₂ C₄₄₃ C₄₄₄ C₄₄₅ C₄₄₆ C₄₄₇ C₄₄₈ C₄₄₉ C₄₅₀ C₄₅₁ C₄₅₂ C₄₅₃ C₄₅₄ C₄₅₅ C₄₅₆ C₄₅₇ C₄₅₈ C₄₅₉ C₄₆₀ C₄₆₁ C₄₆₂ C₄₆₃ C₄₆₄ C₄₆₅ C₄₆₆ C₄₆₇ C₄₆₈ C₄₆₉ C₄₇₀ C₄₇₁ C₄₇₂ C₄₇₃ C₄₇₄ C₄₇₅ C₄₇₆ C₄₇₇ C₄₇₈ C₄₇₉ C₄₈₀ C₄₈₁ C₄₈₂ C₄₈₃ C₄₈₄ C₄₈₅ C₄₈₆ C₄₈₇ C₄₈₈ C₄₈₉ C₄₉₀ C₄₉₁ C₄₉₂ C₄₉₃ C₄₉₄ C₄₉₅ C₄₉₆ C₄₉₇ C₄₉₈ C₄₉₉ C₅₀₀ C₅₀₁ C₅₀₂ C₅₀₃ C₅₀₄ C₅₀₅ C₅₀₆ C₅₀₇ C₅₀₈ C₅₀₉ C₅₁₀ C₅₁₁ C₅₁₂ C₅₁₃ C₅₁₄ C₅₁₅ C₅₁₆ C₅₁₇ C₅₁₈ C₅₁₉ C₅₂₀ C₅₂₁ C₅₂₂ C₅₂₃ C₅₂₄ C₅₂₅ C₅₂₆ C₅₂₇ C₅₂₈ C₅₂₉ C₅₃₀ C₅₃₁ C₅₃₂ C₅₃₃ C₅₃₄ C₅₃₅ C₅₃₆ C₅₃₇ C₅₃₈ C₅₃₉ C₅₄₀ C₅₄₁ C₅₄₂ C₅₄₃ C₅₄₄ C₅₄₅ C₅₄₆ C₅₄₇ C₅₄₈ C₅₄₉ C₅₅₀ C₅₅₁ C₅₅₂ C₅₅₃ C₅₅₄ C₅₅₅ C₅₅₆ C₅₅₇ C₅₅₈ C₅₅₉ C₅₆₀ C₅₆₁ C₅₆₂ C₅₆₃ C₅₆₄ C₅₆₅ C₅₆₆ C₅₆₇ C₅₆₈ C₅₆₉ C₅₇₀ C₅₇₁ C₅₇₂ C₅₇₃ C₅₇₄ C₅₇₅ C₅₇₆ C₅₇₇ C₅₇₈ C₅₇₉ C₅₈₀ C₅₈₁ C₅₈₂ C₅₈₃ C₅₈₄ C₅₈₅ C₅₈₆ C₅₈₇ C₅₈₈ C₅₈₉ C₅₉₀ C₅₉₁ C₅₉₂ C₅₉₃ C₅₉₄ C₅₉₅ C₅₉₆ C₅₉₇ C₅₉₈ C₅₉₉ C₆₀₀ C₆₀₁ C₆₀₂ C₆₀₃ C₆₀₄ C₆₀₅ C₆₀₆ C₆₀₇ C₆₀₈ C₆₀₉ C₆₁₀ C₆₁₁ C₆₁₂ C₆₁₃ C₆₁₄ C₆₁₅ C₆₁₆ C₆₁₇ C₆₁₈ C₆₁₉ C₆₂₀ C₆₂₁ C₆₂₂ C₆₂₃ C₆₂₄ C₆₂₅ C₆₂₆ C₆₂₇ C₆₂₈ C₆₂₉ C₆₃₀ C₆₃₁ C₆₃₂ C₆₃₃ C₆₃₄ C₆₃₅ C₆₃₆ C₆₃₇ C₆₃₈ C₆₃₉ C₆₄₀ C₆₄₁ C₆₄₂ C₆₄₃ C₆₄₄ C₆₄₅ C₆₄₆ C₆₄₇ C₆₄₈ C₆₄₉ C₆₅₀ C₆₅₁ C₆₅₂ C₆₅₃ C₆₅₄ C₆₅₅ C₆₅₆ C₆₅₇ C₆₅₈ C₆₅₉ C₆₆₀ C₆₆₁ C₆₆₂ C₆₆₃ C₆₆₄ C₆₆₅ C₆₆₆ C₆₆₇ C₆₆₈ C₆₆₉ C₆₇₀ C₆₇₁ C₆₇₂ C₆₇₃ C₆₇₄ C₆₇₅ C₆₇₆ C₆₇₇ C₆₇₈ C₆₇₉ C₆₈₀ C₆₈₁ C₆₈₂ C₆₈₃ C₆₈₄ C₆₈₅ C₆₈₆ C₆₈₇ C₆₈₈ C₆₈₉ C₆₉₀ C₆₉₁ C₆₉₂ C₆₉₃ C₆₉₄ C₆₉₅ C₆₉₆ C₆₉₇ C₆₉₈ C₆₉₉ C₇₀₀ C₇₀₁ C₇₀₂ C₇₀₃ C₇₀₄ C₇₀₅ C₇₀₆ C₇₀₇ C₇₀₈ C₇₀₉ C₇₁₀ C₇₁₁ C₇₁₂ C₇₁₃ C₇₁₄ C₇₁₅ C₇₁₆ C₇₁₇ C₇₁₈ C₇₁₉ C₇₂₀ C₇₂₁ C₇₂₂ C₇₂₃ C₇₂₄ C₇₂₅ C₇₂₆ C₇₂₇ C₇₂₈ C₇₂₉ C₇₃₀ C₇₃₁ C₇₃₂ C₇₃₃ C₇₃₄ C₇₃₅ C₇₃₆ C₇₃₇ C₇₃₈ C₇₃₉ C₇₄₀ C₇₄₁ C₇₄₂ C₇₄₃ C₇₄₄ C₇₄₅ C₇₄₆ C₇₄₇ C₇₄₈ C₇₄₉ C₇₅₀ C₇₅₁ C₇₅₂ C₇₅₃ C₇₅₄ C₇₅₅ C₇₅₆ C₇₅₇ C₇₅₈ C₇₅₉ C₇₆₀ C₇₆₁ C₇₆₂ C₇₆₃ C₇₆₄ C₇₆₅ C₇₆₆ C₇₆₇ C₇₆₈ C₇₆₉ C₇₇₀ C₇₇₁ C₇₇₂ C₇₇₃ C₇₇₄ C₇₇₅ C₇₇₆ C₇₇₇ C₇₇₈ C₇₇₉ C₇₈₀ C₇₈₁ C₇₈₂ C₇₈₃ C₇₈₄ C₇₈₅ C₇₈₆ C₇₈₇ C₇₈₈ C₇₈₉ C₇₉₀ C₇₉₁ C₇₉₂ C₇₉₃ C₇₉₄ C₇₉₅ C₇₉₆ C₇₉₇ C₇₉₈ C₇₉₉ C₈₀₀ C₈₀₁ C₈₀₂ C₈₀₃ C₈₀₄ C₈₀₅ C₈₀₆ C₈₀₇ C₈₀₈ C₈₀₉ C₈₁₀ C₈₁₁ C₈₁₂ C₈₁₃ C₈₁₄ C₈₁₅ C₈₁₆ C₈₁₇ C₈₁₈ C₈₁₉ C₈₂₀ C₈₂₁ C₈₂₂ C₈₂₃ C₈₂₄ C₈₂₅ C₈₂₆ C₈₂₇ C₈₂₈ C₈₂₉ C₈₃₀ C₈₃₁ C₈₃₂ C₈₃₃ C₈₃₄ C₈₃₅ C₈₃₆ C₈₃₇ C₈₃₈ C₈₃₉ C₈₄₀ C₈₄₁ C₈₄₂ C₈₄₃ C₈₄₄ C₈₄₅ C₈₄₆ C₈₄₇ C₈₄₈ C₈₄₉ C₈₅₀ C₈₅₁ C₈₅₂ C₈₅₃ C₈₅₄ C₈₅₅ C₈₅₆ C₈₅₇ C₈₅₈ C₈₅₉ C₈₆₀ C₈₆₁ C₈₆₂ C₈₆₃ C₈₆₄ C₈₆₅ C₈₆₆ C₈₆₇ C₈₆₈ C₈₆₉ C₈₇₀ C₈₇₁ C₈₇₂ C₈₇₃ C₈₇₄ C₈₇₅ C₈₇₆ C₈₇₇ C₈₇₈ C₈₇₉ C₈₈₀ C₈₈₁ C₈₈₂ C₈₈₃ C₈₈₄ C₈₈₅ C₈₈₆ C₈₈₇ C₈₈₈ C₈₈₉ C₈₉₀ C₈₉₁ C₈₉₂ C₈₉₃ C₈₉₄ C₈₉₅ C₈₉₆ C₈₉₇ C₈₉₈ C₈₉₉ C₉₀₀ C₉₀₁ C₉₀₂ C₉₀₃ C₉₀₄ C₉₀₅ C₉₀₆ C₉₀₇ C₉₀₈ C₉₀₉ C₉₁₀ C₉₁₁ C₉₁₂ C₉₁₃ C₉₁₄ C₉₁₅ C₉₁₆ C₉₁₇ C₉₁₈ C₉₁₉ C₉₂₀ C₉₂₁ C₉₂₂ C₉₂₃ C₉₂₄ C₉₂₅ C₉₂₆ C₉₂₇ C₉₂₈ C₉₂₉ C₉₃₀ C₉₃₁ C₉₃₂ C₉₃₃ C₉₃₄ C₉₃₅ C₉₃₆ C₉₃₇ C₉₃₈ C₉₃₉ C₉₄₀ C₉₄₁ C₉₄₂ C₉₄₃ C₉₄₄ C₉₄₅ C₉₄₆ C₉₄₇ C₉₄₈ C₉₄₉ C₉₅₀ C₉₅₁ C₉₅₂ C₉₅₃ C₉₅₄ C₉₅₅ C₉₅₆ C₉₅₇ C₉₅₈ C₉₅₉ C₉₆₀ C₉₆₁ C₉₆₂ C₉₆₃ C₉₆₄ C₉₆₅ C₉₆₆ C₉₆₇ C₉₆₈ C₉₆₉ C₉₇₀ C₉₇₁ C₉₇₂ C₉₇₃ C₉₇₄ C₉₇₅ C₉₇₆ C₉₇₇ C₉₇₈ C₉₇₉ C₉₈₀ C₉₈₁ C₉₈₂ C₉₈₃ C₉₈₄ C₉₈₅ C₉₈₆ C₉₈₇ C₉₈₈ C₉₈₉ C₉₉₀ C₉₉₁ C₉₉₂ C₉₉₃ C₉₉₄ C₉₉₅ C₉₉₆ C₉₉₇ C₉₉₈ C₉₉₉ C₁₀₀₀ C₁₀₀₁ C₁₀₀₂ C₁₀₀₃ C₁₀₀₄ C₁₀₀₅ C₁₀₀₆ C₁₀₀₇ C₁₀₀₈ C₁₀₀₉ C₁₀₁₀ C₁₀₁₁ C₁₀₁₂ C₁₀₁₃ C₁₀₁₄ C₁₀₁₅ C₁₀₁₆ C₁₀₁₇ C₁₀₁₈ C₁₀₁₉ C₁₀₂₀ C₁₀₂₁ C₁₀₂₂ C₁₀₂₃ C₁₀₂₄ C₁₀₂₅ C₁₀₂₆ C₁₀₂₇ C₁₀₂₈ C₁₀₂₉ C₁₀₃₀ C₁₀₃₁ C₁₀₃₂ C₁₀₃₃ C₁₀₃₄ C₁₀₃₅ C₁₀₃₆ C₁₀₃₇ C₁₀₃₈ C₁₀₃₉ C₁₀₄₀ C₁₀₄₁ C₁₀₄₂ C₁₀₄₃ C₁₀₄₄ C₁₀₄₅ C₁₀₄₆ C₁₀₄₇ C₁₀₄₈ C₁₀₄₉ C₁₀₅₀ C₁₀₅₁ C₁₀₅₂ C₁₀₅₃ C₁₀₅₄ C₁₀₅₅ C₁₀₅₆ C₁₀₅₇ C₁₀₅₈ C₁₀₅₉ C₁₀₆₀ C₁₀₆₁ C₁₀₆₂ C₁₀₆₃ C₁₀₆₄ C₁₀₆₅ C₁₀₆₆ C₁₀₆₇ C₁₀₆₈ C₁₀₆₉ C₁₀₇₀ C₁₀₇₁ C₁₀₇₂ C₁₀₇₃ C₁₀₇₄ C₁₀₇₅ C₁₀₇₆ C₁₀₇₇ C₁₀₇₈ C₁₀₇₉ C₁₀₈₀ C₁₀₈₁ C₁₀₈₂ C₁₀₈₃ C₁₀₈₄ C₁₀₈₅ C₁₀₈₆ C₁₀₈₇ C₁₀₈₈ C₁₀₈₉ C₁₀₉₀ C₁₀₉₁ C₁₀₉₂ C₁₀₉₃ C₁₀₉₄ C₁₀₉₅ C₁₀₉₆ C₁₀₉₇ C₁₀₉₈ C₁₀₉₉ C₁₁₀₀ C₁₁₀₁ C₁₁₀₂ C₁₁₀₃ C₁₁₀₄ C₁₁₀₅ C₁₁₀₆ C₁₁₀₇ C₁₁₀₈ C₁₁₀₉ C₁₁₁₀ C₁₁₁₁ C₁₁₁₂ C₁₁₁₃ C₁₁₁₄ C₁₁₁₅ C₁₁₁₆ C₁₁₁₇ C₁₁₁₈ C₁₁₁₉ C₁₁₂₀ C₁₁₂₁ C₁₁₂₂ C₁₁₂₃ C₁₁₂₄ C₁₁₂₅ C₁₁₂₆ C₁₁₂₇ C₁₁₂₈ C₁₁₂₉ C₁₁₃₀ C₁₁₃₁ C₁₁₃₂ C₁₁₃₃ C₁₁₃₄ C₁₁₃₅ C₁₁₃₆ C₁₁₃₇ C₁₁₃₈ C₁₁₃₉ C₁₁₄₀ C₁₁₄₁ C₁₁₄₂ C₁₁₄₃ C₁₁₄₄ C₁₁₄₅ C₁₁₄₆ C₁₁₄₇ C₁₁₄₈ C₁₁₄₉ C₁₁₅₀ C₁₁₅₁ C₁₁₅₂ C₁₁₅₃ C₁₁₅₄ C₁₁₅₅ C₁₁₅₆ C₁₁₅₇ C₁₁₅₈ C₁₁₅₉ C₁₁₆₀ C₁₁₆₁ C₁₁₆₂ C₁₁₆₃ C₁₁₆₄ C₁₁₆₅ C₁₁₆₆ C₁₁₆₇ C₁₁₆₈ C₁₁₆₉ C₁₁₇₀ C₁₁₇₁ C₁₁₇₂ C₁₁₇₃ C₁₁₇₄ C₁₁₇₅ C₁₁₇₆ C₁₁₇₇ C₁₁₇₈ C₁₁₇₉ C₁₁₈₀ C₁₁₈₁ C₁₁₈₂ C₁₁₈₃ C₁₁₈₄ C₁₁₈₅ C₁₁₈₆ C₁₁₈₇ C₁₁₈₈ C₁₁₈₉ C₁₁₉₀ C₁₁₉₁ C₁₁₉₂ C₁₁₉₃ C₁₁₉₄ C₁₁₉₅ C₁₁₉₆ C₁₁₉₇ C₁₁₉₈ C₁₁₉₉ C₁₂₀₀ C₁₂₀₁ C₁₂₀₂ C₁₂₀₃ C₁₂₀₄ C₁₂₀₅ C₁₂₀₆ C₁₂₀₇ C₁₂₀₈